

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Fungos endófitos: ferramentas promissoras
nas ciências farmacêuticas**

Olesea Iabanji

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Fungos endófitos: ferramentas promissoras nas ciências farmacêuticas

Olesea Iabanji

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Orientadora: Professora Doutora Maria Manuel Lopes

2019

Resumo

Os fungos endófitos são microrganismos que vivem nos tecidos das plantas durante, pelo menos, parte do seu ciclo de vida, sem, no entanto, provocar sinais de doença. A relação simbiótica detetada entre o fungo endofítico e a planta medicinal é benéfica para ambos, uma vez que o fungo possui maior disponibilidade de nutrientes e a planta possui maior proteção contra diversos patogénicos e maior promoção do crescimento e tolerância a fatores de stress.

Nos últimos anos, os fungos endofíticos têm ganho especial atenção por parte dos investigadores devido às suas capacidades de sintetizar inúmeros novos compostos bioativos importantes em indústrias como a agricultura, medicina e indústria farmacêutica. Com o agravamento de problemáticas como o aumento da resistência aos antimicrobianos e consequente diminuição da eficácia dos fármacos existentes atualmente, a obtenção de novas alternativas terapêuticas tornou-se uma prioridade a nível mundial.

A presente monografia caracteriza a biodiversidade dos endófitos existentes na natureza, assim como também a produção de metabolitos secundários, com especial foco em agentes anticancerígenos, antimicrobianos e antioxidantes, juntamente com outros compostos de elevado interesse para as ciências farmacêuticas.

Em suma, os fungos endofíticos representam uma fonte com forte potencial de exploração de novos compostos químicos, sendo a investigação e o desenvolvimento de metabolitos derivados desta relação simbiótica necessária para um maior aprofundamento. O desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas efetivas para a caracterização desses fungos, a otimização das condições de cultura e a engenharia genética são exemplos de abordagens que poderão possibilitar o aumento do rendimento dos metabolitos secundários desejados e, por conseguinte, o *scale-up* da produção a nível industrial.

Palavras-chave: fungos endófitos, metabolitos secundários, compostos bioativos, aplicação farmacêutica

Abstract

Endophyte fungi are microorganisms that live in plant tissues for at least part of their life cycle without causing signs of disease. The symbiotic relationship detected between the endophytic fungus and the medicinal plant is beneficial for both, since the fungus achieve a greater availability of nutrient and the plant achieve higher levels of protection against various pathogens and promotes growth and tolerance to stressors.

In recent years, endophytic fungi have gained special attention from researchers because of their ability to synthesize numerous important new bioactive compounds in agriculture, medicine and the pharmaceutical industries. With problems such as increased antimicrobial resistance and consequent decrease in the efficacy of existing drugs, new therapeutic alternatives have become a worldwide priority.

This monograph characterizes the biodiversity of naturally occurring endophytes, as well as the production of secondary metabolites, with special emphasis on anticancer, antimicrobial and antioxidant agents, along with other compounds of high interest to the pharmaceutical sciences.

In conclusion, endophytic fungi represent a source with strong potential for the exploration of new chemical compounds, being the research and development of metabolites derived from this symbiotic relationship necessary for further deepening of the issue. The development of effective biotechnological tools for the characterization of these fungi, the optimization of culture conditions and genetic engineering are good examples of approaches that can increase the yield of desired secondary metabolites and scale up production at industrial levels.

Keywords: endophytic fungi, secondary metabolites, bioactive compounds, pharmaceutical application

Agradecimentos

A presente monografia revelou-se o meu maior desafio, mas também o meu maior orgulho a nível académico. A minha perseverança, organização e uma enorme vontade de chegar ao fim foi o que me motivou e o que me deu esperança durante esta última etapa.

Contudo, estes últimos seis meses não teriam sido iguais sem a presença de pessoas que realmente fizeram a diferença. Em primeiro lugar estou muito grata à minha família por estarem sempre lá, por me terem motivado a não perder a esperança e por terem sempre acreditado em mim.

Um especial obrigada à minha irmã Mariana pela compreensão, paciência e por me ter ajudado a ultrapassar as minhas dificuldades. Por ter abdicado dos seus afazeres para me incentivar a fazer mais e melhor e por, acima de tudo, estar sempre lá para mim, incondicionalmente.

Um enorme obrigada também à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Manuel Lopes, por ter aceite este desafio e por ter sido incansável durante todo o processo, fornecendo-me orientações e conselhos que permitiram alcançar este resultado.

Abreviaturas

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ERO - Espécies Reativas de Oxigénio

OMS – Organização Mundial de Saúde

DGS – Direção Geral de Saúde

Glossário

Cariogamia – fusão dos dois núcleos haplóides, geneticamente diferentes, dando origem a um zigoto diplóide.

Dicariote – fungo cuja soma contém dois tipos de núcleos no estado ainda não fundido, isto é, dois tipos de cromossomas, porém não presentes no mesmo núcleo ($n + n$).

Diplóide – núcleo que contém dois pares de cada cromossoma ($2n$).

Fungo – organismo eucariota, heterotrófico, sem clorofila, com um método nutritivo do tipo absorptivo.

Fungo Endófito – fungo residente no interior do tecido de uma planta sem, aparentemente, causar doença.

Fungo Homotálico – fungo capaz de produzir gametângios num mesmo talo, permitindo às suas hifas diferenciarem-se em órgãos sexuais compatíveis e reproduzirem-se.

Fungo Heterotálico – fungo capaz de se reproduzir, fortemente condicionado pela obrigatoriedade de os órgãos sexuais estarem agregados em dois organismos diferentes e necessitarem de um outro fungo, sexualmente compatível, para o fazer.

Haplóide – núcleo que contém um cromossoma de cada tipo (n).

Meiose – processo que contempla a redução do número de cromossomas, devolvendo o carácter haplóide às quatro células formadas.

Metabolito Secundário – é um produto natural, biossintetizado sob certas pressões de seleção biótica ou abiótica num dado nicho ecológico, que não desempenha um papel direto no crescimento, desenvolvimento e reprodução de um organismo.

Mitose – divisão nuclear em que são produzidas duas células-filhas de uma célula-mãe, sem alteração do número de cromossomas.

Planta Medicinal – qualquer planta que, em um ou mais dos seus órgãos, contenha substâncias que possam ser usadas para fins terapêuticos ou que sejam precursoras de compostos farmacêuticos semissintéticos.

Plasmogamia – união dos protoplasmas de duas células fúngicas sexualmente compatíveis, dando origem a uma única célula com dois núcleos diferentes (célula dicarionte).

Tricogina – estrutura delgada e filiforme do gametângio feminino que atua como parte recetora do gametângio masculino e culmina com a plasmogamia, na reprodução sexuada do Filo Ascomycota.

Índice:

1	Materiais e métodos	10
2	Introdução	11
3	Fungos: Origem e caracterização	12
3.1	Reino dos Fungos.....	12
3.2	Importância dos fungos	13
3.3	Morfologia	14
3.4	Reprodução	15
3.4.1	Reprodução Assexuada	16
3.4.2	Reprodução Sexuada.....	17
3.5	Metabolismo	19
4	Microrganismos Endofíticos	22
4.1	Fungos endofíticos: Origem e caracterização	22
4.2	Importância dos Fungos Endofíticos	23
4.3	Metabolitos ativos provenientes dos Fungos Endofítico	24
4.3.1	Anticancerígenos.....	24
4.3.2	Antimicrobianos.....	29
4.3.3	Antioxidantes	33
4.3.4	Outros compostos.....	36
5	Conclusões e perspectivas futuras	39
6	Referências Bibliográficas	41
7	Anexos	47
A1.	Metabolitos secundários com ação anticancerígena.	48
A2.	Metabolitos secundários com ação antimicrobiana.	49
A3.	Metabolitos secundários com ação antioxidante.....	50
A4.	Metabolitos secundários com outras ações terapêuticas.	51

Índice de Figuras:

Figura 1 - Algumas estruturas obtidas a partir de fungos endófitos. 1: Taxol (Paclitaxel), 2: Camptotecina.....	28
Figura 2 - Estrutura de alguns metabolitos secundários com atividade anticancerígena relevantes na indústria farmacêutica. 1: Vinblastina 2: Vincristina (40).....	29
Figura 3 - Compostos antifúngicos isolados de <i>Plectophomella</i> sp., <i>Physalospora</i> sp. e <i>Crataegus monogyna</i>	33
Figura 4 - A estrutura do agente antifúngico Ácido Ambuico (49).....	34
Figura 5 - Estrutura molecular de dois agentes antioxidantes sintetizados pelo fungo <i>Pestalotiopsis microspora</i>	36

1 Materiais e métodos

O processo de recolha de informação para a realização da presente monografia partiu de um plano geral para um plano mais particular, tendo-se utilizado tanto fontes primárias como secundárias. Na elaboração da parte introdutória recorreu-se a livros e artigos de revisão, enquanto que no desenvolvimento do corpo do trabalho recorreu-se, maioritariamente a bases de dados como *PubMed*, *PubChem* e *Elsevier*. Sendo as bases de dados de origem inglesa, os conceitos de base da pesquisa assentaram em expressões como “*endophytic fungi*”, “*secondary metabolites*”, “*bioactive compounds*”, “*pharmaceutical application*”, entre outros.

Em suma, esta monografia engloba um total de 74 referências bibliográficas, maioritariamente redigidas na língua inglesa, dando-se uma especial atenção à veracidade e origem fidedigna da informação consultada.

2 Introdução

Os microrganismos desempenham um papel fundamental no ecossistema, uma vez que são elementos cruciais para manter o equilíbrio e o bom funcionamento do meio ambiente. As bactérias e os fungos são os microrganismos mais prevalentes e, conseqüentemente, os mais importantes.

Ao longo de vários anos de investigação percebeu-se que os fungos são seres responsáveis por executar diferentes funções imprescindíveis para o meio ambiente, tais como decompor matéria orgânica e reciclá-la para obter nutrientes indispensáveis ao seu desenvolvimento e crescimento das plantas (1). A presença destes seres vivos, tanto em patologias como em processos terapêuticos, tem atraído a atenção de investigadores e profissionais do ramo, incentivada pelo impacto, positivo ou negativo, que possuem sobre os restantes seres vivos (2,3).

No entanto, apesar do reino dos fungos apresentar diferentes tipologias e classificações, a presente monografia irá dedicar-se ao estudo dos fungos endófitos e à sua contribuição para a indústria farmacêutica. Caracterizar a biodiversidade dos fungos endófitos existentes na natureza, assim como também analisar quais são os metabolitos secundários produzidos por este tipo de fungos e quais os benefícios que daí advém, são os principais objetivos desta monografia. Adicionalmente, o presente estudo permitirá não só observar e compreender melhor algumas problemáticas atuais como, por exemplo, a crescente resistência aos medicamentos, mas também estudar as ferramentas de investigação mais adequadas para o desenvolvimento de soluções.

Em suma, existe necessidade de maior investigação nesta área devido ao facto de ainda não existirem respostas a uma panóplia de questões como: Qual o mecanismo de ação pelo qual o fungo coloniza a planta? Ou então, de que forma é que podemos otimizar os processos de extração desses metabolitos para aumentar a produção a nível industrial (4)?

3 Fungos: Origem e caracterização

O primeiro metabolito fúngico eficaz foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming, médico e microbiologista, reconhecido através da atribuição do Prémio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1945 (5). O metabolito, posteriormente denominado de “Penicilina”, substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (3), permitiu o tratamento de infecções causadas por bactérias sensíveis. A crescente procura desse tratamento durante a II Guerra Mundial motivou a produção da Penicilina em larga escala e, posteriormente, a investigação de diferentes microrganismos e o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos (6).

3.1 Reino dos Fungos

Os fungos são organismos eucariotas, na maior parte saprófitas, sem clorofila e com parede celular constituída maioritariamente por quitina. Neles estão incluídos organismos de formas e dimensões muito variadas (7).

De um modo geral existem três tipos de fungos: 1) os fungos leveduriformes, usualmente designados de leveduras, 2) os fungos filamentosos e 3) os fungos dimórficos. Os primeiros são fungos unicelulares e os segundos são pluricelulares, sendo estes últimos de maior abundância (6). Por sua vez, os fungos dimórficos apresentam duas formas de crescimento dependendo da temperatura ambiente, tal como descrito posteriormente em 3.3.

A nutrição destes seres vivos efetua-se de uma forma particular, uma vez que digerem os alimentos no exterior, através da secreção de enzimas para o meio ambiente. Essas enzimas degradam a matéria orgânica em pequenas moléculas que serão posteriormente absorvidas pelas células do fungo, conseguindo, este último,

nutrir-se, crescer e desenvolver-se. A principal reserva dos fungos é o glicogénio, juntamente com outros compostos lipídicos (8).

Inicialmente os fungos foram classificados e inseridos no Reino das Plantas devido à aparente semelhança, nomeadamente no que diz respeito ao facto de ambos serem seres com estruturas enraizadas. Mais tarde, percebeu-se que os fungos apresentam algumas diferenças significativas em relação às plantas, tais como, por exemplo, o seu método de absorção não ser fotossintético e possuírem uma composição química diferente ao nível da parede celular. Essas e outras características descobertas por Wainright, Hinkle e vários outros cientistas ao longo dos anos levaram à criação de um novo reino, o Reino dos Fungos (9).

Os fungos apresentam uma elevada diversidade, mais de 100 mil espécies, e uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados em diversos habitats terrestres, até mesmo em condições climáticas extremas como no deserto ou crescendo dentro de rochas, casca, solo, folhas ou musgos.

Trata-se de um Reino que abrange uma panóplia de fungos estruturalmente e morfológicamente diferentes entre si, contudo todos igualmente importantes para a manutenção da homeostasia do ecossistema biológico, de acordo com o relatório publicado em 2018 “*State of the Worl’s Fungi*” (1).

3.2 Importância dos fungos

De acordo com Lucking, R., *et al.*, os fungos co-habitam a Terra há aproximadamente mil milhões de anos (10) e atualmente temos 144 000 espécies identificadas e classificadas, com um ritmo de crescimento exponencial de 2000 espécies por ano, segundo o *State of the Worls’s Fungi* 2018 (1).

Algumas famílias de fungos são alvo de maior investigação por parte dos micologistas, seja pela sua importância económica, como é o caso da família *Agaricaceae* (cogumelos) ou pela sua relevância biomédica, como a *Aspergillaceae* (que inclui os fungos *Aspergillus* e *Penicillium*), incentivada pela sua produção de toxinas e antibióticos.

Os fungos são usados em diversas áreas, sendo as de maior destaque a agricultura, a gastronomia com a produção de bebidas (como é o caso do vinho e da

cerveja) e alimentos (como os cogumelos, queijo, pão), produção de combustíveis e também a medicina.

Relativamente à medicina, os fungos contribuíram de forma significativa pois permitiram o desenvolvimento e a produção de inúmeros fármacos que revolucionaram a terapêutica de diversas patologias. Por exemplo, a Penicilina proveniente do fungo *Penicillium chrysogenum*, revolucionou o tratamento de uma panóplia de infeções bacterianas, enquanto a Ciclosporina do fungo *Tolypocladium inflatum* tornou possível o transplante de órgãos, ajudando a prevenir a rejeição de órgãos doados (11). Outros exemplos de grande destaque são a redução do colesterol com a Lovastatina de *Aspergillus terreus* e o Fingolimod derivado da miriocina (ISP-1), um metabolito do fungo *Isaria sinclairii* usado na Esclerose Múltipla (12).

3.3 Morfologia

Dentro dos vários tipos de fungos, os mais importantes são os fungos leveduriformes e os fungos filamentosos. Os fungos filamentosos são constituídos por filamentos ou hifas e os fungos leveduriformes ou unicelulares, como o próprio nome indica, são formados apenas por uma célula. Tanto os fungos filamentosos como os leveduriformes estão envolvidos por uma parede celular rígida, que lhes confere a forma (13).

Nos fungos pluricelulares, o protoplasma pode ser contínuo e multinucleado constituindo as hifas asseptadas ou cenocíticas. Por sua vez, as hifas em que o protoplasma aparece interrompido regularmente por invaginações interiores da parede, os septos, que dividem as hifas em compartimentos individualizados designam-se hifas septadas. Os principais constituintes químicos parietais são os polissacáridos associados a proteínas e lípidos (7). O tipo de polissacáridos varia entre os principais grupos.

Assim sendo, a análise química de fungos septados e leveduriformes (Ascomycota e Basidiomycota) mostra a presença de quitina e de glucanos, enquanto a dos fungos asseptados (Zigomicota) apresenta uma mistura de quitina e quitosano, associados a ácidos glucorónicos em vez de glucanos (14).

Tal como referido anteriormente, alguns fungos denominam-se dimórficos, uma vez que podem alternar entre duas morfologias, a leveduriforme e a filamentosa,

segundo pressão ambiental. Tal como Stuart Walker refere em “*Microbiology*” ou Gerard Tortora em “*Microbiologia*”, a diferenciação ocorre perante alterações ambientais, como a temperatura, a disponibilidade de nutrientes ou até mesmo tensão de CO₂ (2,13).

3.4 Reprodução

A fase de reprodução dos fungos envolve a formação e libertação de grandes quantidades de esporos, sendo uma fase posterior a um período de crescimento e maturação. Os fungos podem utilizar várias alternativas de reprodução, a reprodução fsexuada, assexuada, parassexual e, ainda a denominada reprodução vegetativa.

A reprodução sexuada envolve a união de duas células ou de dois órgãos sexuais compatíveis. Por sua vez, a reprodução assexuada, a mais importante para a propagação da espécie por se repetir inúmeras vezes durante o ano, consiste na produção de esporos assexuais produzidos pelos fungos por mitose e, consequentemente, por divisão celular. Os conidiósporos e os esporangiósporos são exemplos de esporos resultantes deste tipo de reprodução.

A reprodução vegetativa é também um tipo de reprodução de fungos, porém é menos frequente, caracterizada pela ausência de obrigatoriedade de estruturas reprodutoras específicas. Este processo acontece quando, uma pequena parte da hifa dá origem a um novo micélio, consoante as condições do meio envolvente. Os fungos que utilizam unicamente este tipo de reprodução vegetativa denominam-se *Mycelia sterilia* (7).

Por sua vez, o ciclo parassexual caracteriza-se pela ocorrência de anastomose e posterior troca de núcleos entre fungos geneticamente distintos, mas que apresentam compatibilidade vegetativa. Forma-se assim um micélio heterocariótico, isto é, com núcleos geneticamente distintos. No entanto, este processo considera-se instável, uma vez que se fundem núcleos diferentes, originando um núcleo diplóide, o qual, para retornar à condição haplóide, deve sofrer perdas cromossomais (15). Este tipo de reprodução constitui um importante mecanismo de variação genética para os fungos que não apresentam reprodução sexuada ou a apresentam muito raramente.

Assim sendo, conseguimos verificar que os fungos possuem a vantagem de poderem utilizar qualquer uma das formas reprodutivas, isoladamente ou em combinação (14).

De uma forma geral, e num jeito de conclusão, conseguimos afirmar que os fungos leveduriformes se podem reproduzir de forma assexual por gemulação ou cissiparidade e/ou de forma sexual através da produção de esporos sexuais, como os ascósporos e basidiósporos. Por sua vez, os fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente por fragmentação das hifas ou por produção de esporos assexuais e sexuadamente através da produção de esporos sexuais: zigósporos, ascósporos ou basidiósporos.

3.4.1 Reprodução Assexuada

A reprodução assexuada condissera-se o tipo de reprodução mais importante para a propagação da espécie devido à frequência com que a mesma ocorre no período de um ano. Os esporos assexuais podem formar-se de duas maneiras: dentro de estruturas, dando origem a endósporos ou esporangiósporos, ou externamente, a partir do soma fúngico, dando origem a exósporos ou conídios (13).

Os esporangiósporos são produzidos no interior de uma estrutura semelhante a um saco, o esporângio, cujo citoplasma é convertido por clivagem com formação de vários esporos. Estes esporangiósporos podem ser móveis ou imóveis. Os imóveis são os que caracterizam os fungos patogénicos para o Homem. Por sua vez, os esporos móveis podem ser providos de um ou dois flagelos e denominam-se de zoósporos (7).

Estes endósporos são produzidos por fungos filamentosos asseptados cuja classificação se baseia, essencialmente, na estrutura do esporângio, e dos esporangiósporos da hifa diferenciada que o suporta. Em alguns casos essa classificação baseia-se também numa estrutura estéril, a columela, que separa a região esporulante da não esporulante (14). Os esporangiósporos são maioritariamente produzidos por fungos pertencentes ao filo ou divisão dos Zigomicota, como por exemplo o género *Rhizopus*.

Os conídios são produzidos por fungos pertencentes às divisões dos Ascomicota, Basidiomicota e Deuteromicota (*Fungi imperfecti*). Estes exósporos, característicos dos fungos septados, são produzidos por células especiais denominadas

células conidiogéneas, que podem estar assentes noutras estruturas, os conidióforos (8).

Existem dois processos fundamentais de conidiogénese, a tálica e a blástica. Na conidiogénese tálica verifica-se a conversão de um elemento pré-existente da hifa fértil em conídio. Por outro lado, na conidiogénese blástica, a célula conidiogénea começa a formar um rebento que, uma vez individualizado por um septo, dará origem a um conídio.

3.4.2 Reprodução Sexuada

A reprodução sexuada é um processo muito complexo e apresenta variações entre os diferentes grupos de fungos. Este processo envolve três fases sucessivas e distintas: plasmogamia, cariogamia e meiose. Na plasmogamia observa-se a união dos protoplasmas de duas células fúngicas sexualmente compatíveis dando origem a uma única célula com dois núcleos diferentes. A fusão de dois núcleos haplóides (cariogamia), geneticamente diferentes, dá origem a um zigoto diplóide. Este, mais cedo ou mais tarde, sofre uma meiose que, reduzindo o número de cromossomas, devolve o carácter haplóide às quatro células formadas as quais, posteriormente, podem sofrer uma ou várias mitoses (2).

Os fungos que se reproduzem sexuadamente são classificados nas divisões ou filos Zigomicota, Ascomicota e Basidiomicota, consoante as estruturas reprodutoras a que dão origem. Porém, existem fungos em que apenas são conhecidas as estruturas assexuais e, por isso mesmo, pertencem à divisão Deuteromicota.

Existem aproximadamente 1000 espécies de fungos pertencentes ao filo Zigomicota, sendo que a maioria vive em matéria animal ou vegetal em decomposição no solo, sendo alguns patogénicos de plantas e outros animais, inclusive o Homem.

Alguns dos fungos pertencentes a esta divisão são dimórficos, mas a maioria são fungos filamentosos asseptados e saprófitas. No entanto, todos eles possuem uma característica em comum que é a produção de esporos sexuais denominados zigósporos, sendo formados dentro de uma estrutura designada de zigosporângio.

Quando duas hifas sexualmente compatíveis se encontram, desenvolvem ramificações denominadas zigóforos. Por sua vez, dois zigóforos compatíveis, em presença um do outro, vão transformar-se em gametângios. Estes, após plasmogamia,

dão origem ao zigosporângio jovem que, com o tempo, irá aumentar o seu volume e espessar as suas paredes dando origem ao zigosporângio, que contém um único núcleo diplóide – o zigósporo. Este, em condições ambientais apropriadas, sofre meiose, germina, produz um esporângio e o ciclo de vida começa novamente. Como exemplos de fungos pertencentes a este filo temos *Rhizopus* spp. e *Mucor* spp.

O filo Ascomycota é o maior filo do Reino dos Fungos, compreendendo cerca de 30 000 espécies. É uma divisão com grupos muito variados, sendo alguns fungos de elevada importância económica (fabrico da cerveja, pão e vinho) e outros a causa de doenças nas plantas e deterioração dos alimentos (1).

Todos os membros pertencentes a este filo produzem esporos sexuais denominados ascósporos, dentro de uma estrutura tipo saco, o asco, podendo ser produzidos livremente ou estarem contidos em estruturas específicas, denominadas ascocarpos (2).

Ao contrário do filo Zigomicota, a maioria destes fungos são filamentosos septados devido às estruturas reprodutoras complexas. Este filo engloba também algumas leveduras, por exemplo *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces octosporus*, e fungos dimórficos (16).

De um modo geral, o processo de reprodução deste tipo de fungos começa com a produção de dois gametângios, o masculino e o feminino, denominado anterídio e ascogónio, respetivamente. De seguida, dá-se a plasmogamia com a passagem dos núcleos do anterídio para o ascogónio, através da tricogina. Consequentemente, forma-se a célula-mãe do asco, onde ocorre a cariogamia e subsequente formação do zigoto, seguida de meiose e, eventualmente algumas mitoses. Os núcleos resultantes envolvem-se de uma parede e dão origem aos ascósporos maduros, e repete-se o ciclo (7).

A divisão Basidiomycota engloba cerca de 25 000 espécies de fungos e, tal como a Ascomycota, a maioria são fungos filamentosos septados. Deste filo fazem parte todos os fungos que se reproduzem sexuadamente por basidiósporos, libertados externamente a partir de estruturas especiais denominadas basídios (16).

Quando o basidiósporo germina produz o micélio primário monocariótico, contudo, após a fusão de duas células uninucleadas – plasmogamia – verifica-se a formação de uma célula binucleada, o micélio secundário dicariótico. O micélio terciário que é também dicariótico deriva diretamente do micélio secundário e forma os basidiocarpos.

De seguida formam-se as ansas de conexão, os núcleos dividem-se mitoticamente e a cariogamia ocorre entre dois núcleos haplóides à medida que o basídio se desenvolve. Segue-se a meiose para produzir quatro núcleos haplóides e, naturalmente, forma-se um vacúolo no interior do basídio que vai empurrar os núcleos para o exterior, circundados de uma parede, para formar quatro basidiósporos e o ciclo repete-se novamente (7).

3.5 Metabolismo

O metabolismo fúngico descreve-se como um conjunto de reações químicas envolvidas na manutenção da sobrevivência das células do organismo, podendo ser dividido em duas categorias: o anabolismo e o catabolismo. Durante as reações anabólicas sintetizam-se novos compostos (moléculas mais complexas) a partir de moléculas simples, com consumo de energia. Por sua vez, as reações catabólicas podem ser interpretadas como reações químicas que produzem elevadas quantidades de energia a partir da decomposição de moléculas mais complexas (17).

Através deste processo, os fungos produzem uma elevada quantidade de metabolitos, podendo estes serem de origem primária ou secundária. Os metabolitos primários são compostos essenciais para a sobrevivência do fungo, pois fornecem energia e precursores químicos essenciais para o crescimento do mesmo. No entanto, apenas são produzidos quando não podem ser obtidos a partir do meio de crescimento. Exemplos típicos destes produtos são proteínas, hormonas polipeptídicas, ciclopeptídeos, enzimas ou ácidos gordos (18).

Os metabolitos primários estão associados à fase inicial de crescimento do organismo, sendo que a produção máxima ocorre perto do final desta fase, uma vez que o fungo entra na fase estacionária de crescimento. Estes compostos podem ser utilizados de acordo com diversas finalidades, nomeadamente, crescimento e desenvolvimento de hifas, metabolismo energético, regulação do metabolismo fúngico ou intermediário na biossíntese de diversos agentes (19).

Em contrapartida, os metabolitos secundários são compostos orgânicos, de baixo peso molecular, que derivam das vias metabólicas primárias, porém não são considerados essenciais para o crescimento e reprodução dos fungos. Estes compostos são frequentemente utilizados mediante diferentes finalidades, tais como, competição,

antagonismo e mecanismos de autodefesa contra outros seres vivos para permitir que o fungo ocupe o nicho e utilize a fonte alimentar (20).

Os metabolitos secundários são produzidos no final da fase de crescimento do fungo e em elevadas quantidades, sendo que cada um destes compostos desempenham diversas funções. Assim sendo, essas funções prendem-se com atividades antibióticas e de importância farmacêutica, possibilidade de serem superproduzidos em cultura adequada e de desempenhar funções diferenciais como hormonas sexuais e efeitos inibidores de outros microrganismos. Ao contrário do sucedido no metabolismo primário, o metabolismo secundário apenas ocorre em algumas espécies, géneros, ou até mesmo estirpes (19).

Geralmente, a produção secundária de metabolitos inicia-se numa fase mais tardia do crescimento do microrganismo, normalmente ao entrar na fase estacionária ou de repouso. Adicionalmente, constatou-se ainda que as condições ambientais necessárias para a esporulação e para o metabolismo secundário eram muitas vezes semelhantes e mais rigorosas do que aquelas exigidas aquando do crescimento vegetativo puro (20).

Assim sendo, os fungos conseguem produzir milhares de metabolitos secundários, como por exemplo, melanina, hormonas sexuais, micotoxinas, esteróides, sesquiterpenos, gibberalinas, antibióticos (tais como, a penicilina, a cefalosporina e a griseofulvina), agentes psicotrópicos (psilocibina e LSD) e alcalóides ergóticos (21).

Para além dos compostos farmacologicamente ativos que se obtém a partir do metabolismo fúngico, como os alcalóides do ergot e a lipase, existem outras fontes extremamente importantes para a produção de novos compostos. Por exemplo, um grupo de bactérias filamentosas designadas de actinomicetes, como é o caso de *Streptomyces*, consideram-se um dos principais produtores de inúmeros antibióticos e metabolitos secundários de elevada importância para a indústria farmacêutica (18).

Nos últimos anos, realizaram-se progressos significativos no que diz respeito à identificação e elucidação de vias metabólicas que conectam o desenvolvimento de fungos à biossíntese natural de produtos. No entanto, a complexidade dessas redes, com vários locais de destino e interconexões com outros mecanismos reguladores, fazem com que a sua exposição completa seja uma tarefa desafiante (21).

Portanto, avanços científicos neste campo de aplicação irão, consequentemente, contribuir de forma significativa para a síntese de novos compostos com ação farmacológica relevante na indústria farmacêutica.

4 Microrganismos Endofíticos

4.1 Fungos endofíticos: Origem e caracterização

Desde a descoberta da penicilina que os fungos têm vindo a obter maior destaque devido ao opulento repositório de compostos medicinalmente importantes que se têm vindo a identificar desde então. Por outro lado, as plantas foram e continuam a ser a principal fonte de novas moléculas biologicamente ativas e, por isso mesmo, a cada nova molécula relatada a partir de uma fonte vegetal, segue-se a extinção dessa planta devido à colheita excessiva da mesma (22).

Tendo isso em vista e, havendo a necessidade de colmatar esses obstáculos, a atenção virou-se para um tipo de microrganismos denominados endófitos ou endofíticos que foram descritos pela primeira vez por Heinrich Anton de Bary, em 1866. De Bary definiu endofítico como sendo “um organismo que reside dentro dos tecidos vegetais” (23). Esse organismo poderia ser fungo, bactéria, alga ou inseto, no entanto, a maioria das pesquisas têm-se concentrado em fungos endofíticos.

Esse conceito tem vindo a sofrer alterações ao longo dos anos e, atualmente, define-se como sendo um “fungo que vive simbioticamente nos tecidos de plantas vivas durante, pelo menos, parte do seu ciclo de vida, sem, no entanto, provocar quaisquer sinais de doença” (24,25).

A relação simbiótica detetada entre a planta medicinal e o fungo endófito é benéfica para ambas as partes: para o endófito devido à disponibilidade de nutrientes provenientes da planta e benéfica para a planta devido, nomeadamente à facilidade de obtenção de proteção contra diversos patógenos, aumento do *uptake* de nutrientes, promoção do crescimento e tolerância a fatores de stress (26,27).

O estudo de fungos endófitos aumentou consideravelmente desde a descoberta do Taxol, um dos agentes anticancerígenos mais utilizados na prática clínica. Este diterpenóide pode ser produzido pelo fungo endófito *Taxomyces andreanae* a partir da planta medicinal *Taxus brevifolia*. A partir desta descoberta, evidenciou-se o benefício resultante da associação de fungos endófitos e plantas medicinais e o consequente contributo que poderiam trazer na história da medicina e seu desenvolvimento (28).

Segundo Pramod Kumar Pandey *et al.*, os fungos endofíticos existem em quase todas as espécies de plantas naturais localizadas em ambientes geográficos muito diversificados, isoladas a partir de diferentes partes da planta, em condições ambientais distintas (29). Embora se consigam extrair metabolitos secundários biologicamente ativos a partir de diferentes partes da planta hospedeira, geralmente a maior quantidade dos mesmos provém das folhas. Um bom exemplo disso é retratado por Sheela Chandra num artigo onde evidencia que se consegue extrair maior percentagem de Camptotecina (um potente agente anticancerígeno) das folhas da *Ophiorrhiza rugosa* do que das outras partes da planta em questão (30).

4.2 Importância dos Fungos Endofíticos

O estudo dos fungos endofíticos tem vindo a ganhar importância devido a algumas problemáticas prevalentes na atualidade como a resistência aos antibióticos e a necessidade de investigação e desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos para combater patologias que ainda carecem de tratamento, como, por exemplo, o cancro (31).

Muitos fungos endofíticos, ao se associarem a uma planta medicinal, conseguem modificar as defesas da mesma alterando fatores de stress bióticos e abióticos, ou seja, aumentando a produção de metabolitos secundários biologicamente ativos, melhorando a defesa contra diversos organismos patogénicos e a estabilidade da membrana, regulação do sistema antioxidante, entre outras (23).

A relação simbiótica descrita e a consequente produção de inúmeros metabolitos secundários biologicamente ativos fazem com que os mesmos possam ser utilizados em diversas áreas, desde a agricultura, meio ambiente, medicina, biorremediação ambiental, energia, biocatálise e indústria farmacêutica (24).

Nesta monografia o que nos interessa destacar é o impacto que os metabolitos secundários biologicamente ativos provenientes dos fungos endófitos possuem na área da medicina, com o objetivo primordial de evidenciar o facto de que os mesmos podem ser ferramentas revolucionárias por atuarem como agentes terapêuticos contra numerosas patologias.

Do ponto de vista das aplicações farmacológicas, os fungos endófitos foram relatados como sendo produtores de novos compostos biologicamente ativos, com atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, antitumorais, antimaláricas, antimicobacterianas, entre outras (32,33).

Existe, por isso mesmo, uma necessidade de maior investigação nesta área devido ao facto de ainda não existirem respostas a uma panóplia de questões como: qual o mecanismo de ação pelo qual o fungo coloniza a planta? Quais as condições climáticas necessárias para o crescimento e desenvolvimento de um fungo endófito *in planta* e/ou *in vitro*? Como é que a planta se mantém assintomática com a invasão do endófito? De que forma é que o fungo consegue suprimir os mecanismos de defesa da planta (34)? Como e por que razão um fungo endófito produz metabolitos secundários (35)? De que forma é que podemos otimizar os processos de extração desses metabolitos para aumentar a produção a nível industrial (4)? Qual ou quais são as melhores estratégias para isolamento, identificação e extração de metabolitos ativos, tanto a nível laboratorial como industrial?

Segundo Humeera Nisa, vários estudos contribuíram para a descoberta de importantes metabolitos secundários provenientes da relação simbiótica entre fungos endófitos e plantas medicinais, aumentando assim a perspetiva de usar esses organismos como fontes alternativas desses metabolitos (36).

4.3 Metabolitos ativos provenientes dos Fungos Endofítico

4.3.1 Anticancerígenos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é um “grupo de doenças caracterizado pelo crescimento de células anormais para além dos seus limites habituais, que podem invadir partes adjacentes do corpo humano e/ou se espalhar para outros órgãos” (37).

O cancro é a segunda causa de morte em todo o mundo e estima-se que tenham ocorrido 9,6 milhões de óbitos em 2018 (37). Por isso mesmo, existe uma elevada necessidade de descobrir e desenvolver novas alternativas terapêuticas que tenham elevada eficácia, qualidade e segurança.

Os compostos químicos derivados de plantas são uma fonte apelativa para identificação de novas moléculas biologicamente ativas devido à elevada diversidade encontrada na natureza. Foi através destes compostos que se identificou e desenvolveu inúmeros agentes anticancerígenos, tal como o Taxol e os Alcalóides de Vinca, tal como será descrito mais a frente neste capítulo (33).

Por outro lado, os baixos rendimentos, o crescimento lento e a exigência de condições específicas de produção (como, por exemplo, o stress, a biodisponibilidade nutritiva e as condições climáticas) são problemáticas que impedem que estes compostos sejam produzidos a nível industrial para suprir as necessidades existentes atualmente. A colheita excessiva de plantas medicinais para extração de produtos com interesse farmacêutico levaram à extinção de determinadas espécies, tornando-as ainda mais vulneráveis e ameaçadas (30).

Considerando as limitações acima descritas, os microrganismos surgiram como nova alternativa para a produção de metabolitos secundários com interesse na área da saúde. Esta alternativa é mais promissora do que as plantas medicinais, uma vez que se trata de uma fonte renovável, reproduzível e inesgotável de novas estruturas com elevado interesse na indústria farmacêutica. De entre todos os microrganismos, os fungos são a classe mais estudada, pois têm um longo reportório como fonte de produção de metabolitos bioativos com diferentes atividades (32).

A pesquisa de metabolitos secundários anticancerígenos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas medicinais tem crescido e evoluído consideravelmente desde a descoberta do Taxol, isolado pela primeira vez da casca de *Taxus brevifolia*, em 1971 (38).

O **Taxol**, também designado Paclitaxel, é um composto diterpenóide que atraiu mais atenção e interesse do que qualquer outro agente anticancerígeno desde a sua descoberta, tendo sido intitulado como o primeiro agente anticancerígeno que custou mil milhões de dólares (30).

Posteriormente, o Taxol também foi encontrado em *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico isolado da casca de *Taxus brevifolia* (28). Inúmeras outras espécies de *Taxus* produzem Taxol, nomeadamente, *Taxus baccata*, *Taxus cuspidata*, *Taxus*

canadensis, *Taxus chinensis*, *Taxus x media*, *Taxus floridana*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus mairei*, *Taxus sumatrana* e *Taxus wallichiana*.

Por sua vez, Qiao *et al.* demonstraram que o Taxol pode ser produzido por fungos endofíticos isolados de outras plantas. Eles isolaram o Taxol do fungo endofítico *Aspergillus aculeatinus*, extraído da casca interna e externa da planta *Taxus chinensis* var. *mairei* (39).

A Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso do Taxol no tratamento do cancro da mama, próstata, pulmão e cancro refratário do ovário (ver Figura 1) (33).

Este composto representa uma nova classe de agentes anticancerígenos devido ao seu mecanismo de ação ser tão distinto da de todos os outros compostos. O Paclitaxel estabiliza os microtúbulos promovendo a polimerização dos mesmos. Esta estabilização invulgar bloqueia a capacidade das células de separarem o fuso mitótico durante a divisão celular e, por conseguinte, as células ficam bloqueadas na fase G2/M do ciclo celular, culminando com a morte das mesmas (30).

Outro composto anticancerígeno de elevada relevância é o alcalóide **Camptotecina** (CPT), tendo sido isolado pela primeira vez por Wall *et al.*, da casca da *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae), uma planta medicinal nativa da China Continental. Posteriormente, Fazilath Uzma *et al.* e vários outros investigadores científicos perceberam que existiam inúmeras outras espécies de plantas que conseguiam produzir este alcalóide, tal como é o caso de *Nothapodytes foetida*, *Apodytes dimidiata*, *Nothapodytes nimmoniana*, entre outras (29,40).

É de realçar ainda que a quantidade de CPT produzida depende não só do tipo de fungo que coloniza a planta, mas também da espécie da planta, tipo de cultura, método de extração, sendo este aspeto transversal aos outros metabolitos bioativos extraídos dos fungos endófitos. Tendo em conta esses determinantes, chegou-se a conclusão de que as duas espécies que produzem maiores rendimentos de CPT é a espécie *Nothapodytes nimmoniana* e a *Camptotheca acuminata* (30,40).

O mecanismo de ação da Camptotecina baseia-se no bloqueio do DNA eucariótico, em que o principal alvo é a enzima DNA Topoisomerase I, que é a responsável pelo desdobramento do DNA durante a replicação e transcrição do mesmo (24,28,30).

A partir da CPT conseguiu-se sintetizar uma panóplia de compostos análogos como potenciais agentes terapêuticos, como é o caso dos análogos 9-metoxi-

camptotecina e 10-hidroxi-camptotecina, que juntamente com a CPT são importantes precursores de fármacos anticancerígenos como o Topotecano e o Irinotecano (ver Figura 1). Contudo, apesar do potencial uso terapêutico destes compostos, a Camptotecina não modificada possui desvantagens que comprometem as suas aplicações devido não só à sua baixa solubilidade em meio aquoso, mas também devido à sua elevada toxicidade (33,41).

Este alcalóide com atividade anticancerígena inibe a replicação do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) *in vitro* e induz uma remissão completa do cancro do pulmão, mama, uterino e cervical (42).

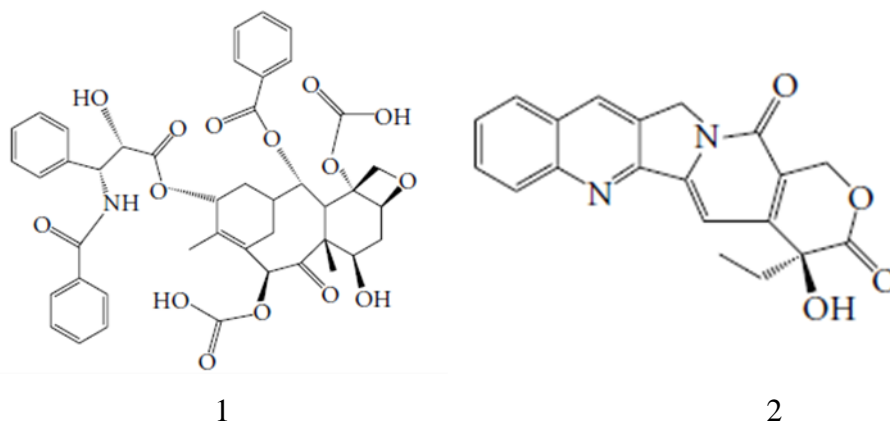


Figura 1 - Algumas estruturas obtidas a partir de fungos endófitos.

1: Taxol (Paclitaxel), 2: Camptotecina

A planta *Catharanthus roseus* produz mais de cem alcalóides com interesse na indústria farmacêutica, sendo os mais conhecidos a **Vincristina** e a **Vinblastina**. Esses dois alcalóides de vinca podem ser produzidos por vários fungos endófitos, hospedeiros da *C. roseus*, como *Colletotrichum* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Nigrospora sphaerica* e *Fusarium solani* (40,43).

A Vincristina e a Vinblastina são amplamente utilizados em regimes de quimioterapia para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos, bem como a Doença de Hodgkin e a Leucemia. Assim sendo, a pergunta que se coloca é qual o mecanismo de ação através do qual estes compostos atuam na terapêutica destas patologias? Estes agentes anticancerígenos bloqueiam o ciclo celular na metáfase e ligam-se à tubulina, impedindo assim que a célula produza os fusos mitóticos necessários para a sua divisão, alcançando, assim, a apoptose. Segundo estudos já realizados no âmbito desta temática persistem ainda inconsistências que carecem de mais investigação (24,30,44,45).

Embora a Vincristina e a Vinblastina possuem apenas pequenas diferenças estruturais e se comportem da mesma forma no nível da interação fármaco-tubulina, a sua toxicidade e espectro de atividade diferem consideravelmente (ver Figura 2) (40,46).

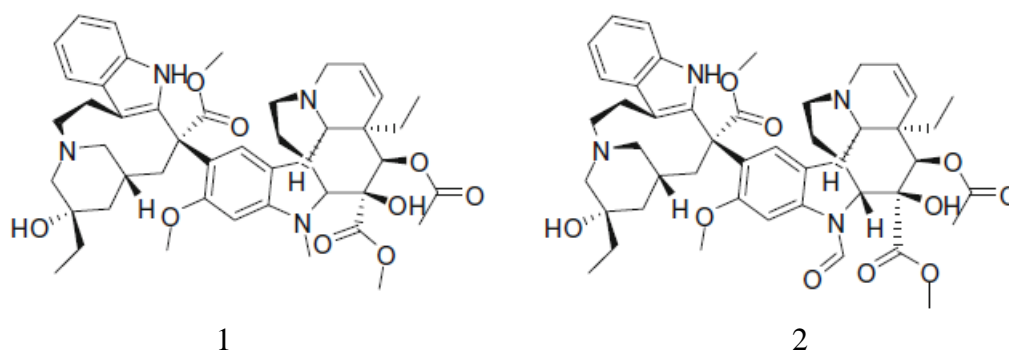


Figura 2 - Estrutura de alguns metabolitos secundários com atividade anticancerígena relevantes para a indústria farmacêutica.

1: Vinblastina 2: Vincristina (40).

A **Podofilotoxina** (PPT) é um composto natural farmacologicamente ativo que pertence ao grupo químico dos Lignanós, classificado como agente anticancerígeno. Este composto, possui elevada toxicidade, e, por isso mesmo, não é utilizado clinicamente. Para ultrapassar esse problema, a PPT é utilizada como precursor na síntese de análogos que possuem menor toxicidade mas boa eficácia, como por exemplo, o Etoposido e o Teniposido, de forma a poderem ser usados na prática clínica (47).

Os análogos referidos anteriormente são empregados em terapêuticas de várias patologias, nomeadamente na do cancro do pulmão, testículos e uma variedade de leucemias e outros tumores sólidos (30,47,48).

A Podofilotoxina funciona como inibidor mitótico através da ligação reversível à tubulina e da inibição da aglomeração dos microtúbulos, que é um passo crucial na divisão celular (30). Apesar de a PPT ser estruturalmente muito semelhante aos seus análogos, estes compostos possuem diferenças consideráveis no que diz respeito ao seu mecanismo de ação, toxicidade e atividade anticancerígena (48).

A Podofilotoxina é extraída de raízes e rizomas de duas espécies de *Podophyllum* – *Podophyllum hexandrum* e *Podophyllum peltatum* L. Devido à elevada procura da Podofilotoxina instalou-se a sobre-exploração da planta *P.*

hexandrum, tornando-se, por consequência desse ato, uma espécie em vias de extinção (30).

Assim sendo, os fungos endófitos são considerados uma alternativa promissora para a indústria farmacêutica, uma vez que são uma fonte inesgotável de compostos com atividade farmacológica considerável, sem ameaçar a biodiversidade existente na Natureza. Segundo Pramod Kumar Pandey *et al.* publicaram no *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review na Research* em 2014, alguns dos fungos endófitos que produzem Podofilotoxina são *Sinopodophyllum hexandrum*, *Dysosma veitchii*, *Sabina vulgaris*, *Juniperus communi*, entre outros (29).

Adicionalmente, existem outros metabolitos secundários que estão em fase de investigação e desenvolvimento para que sejam utilizados como fontes naturais na síntese de novas moléculas promissoras nas Ciências Farmacêuticas. O Ácido Torreiano isolado do fungo *Torreya taxifolia* a partir da planta *Pestalotiopsis microspora* (49), as Citocalasinas do *T. wifordii* a partir da planta hospedeira *Rhinocladiella* sp., os Fenilpropanóides isolados do fungo *Penicillium brasilianum*, que foi exportado da planta *Melia azedarach* (29), a Ergoflavina isolada do *Penicillium oxalicum* proveniente da *Mimusops elengi* (Sapotaceae) (50) entre muitos outros.

4.3.2 Antimicrobianos

Nos últimos anos, a resistência aos antimicrobianos tem-se revelado uma das maiores ameaças à saúde da população a nível mundial. Segundo a OMS, a resistência aos antimicrobianos define-se como “a capacidade que os microrganismos (bactérias, fungos, entre outros) possuem para impedir que os mesmos atuem contra eles próprios” (51). Consequentemente, as terapêuticas atuais tornam-se ineficazes e as infecções persistem, podendo alastrar-se a outros indivíduos.

A principal causa desta ameaça reside ou está interligada com o uso indevido dos antimicrobianos, aumentando assim não só o número, mas também os tipos de organismos resistentes. Assim sendo, num futuro próximo muitas doenças infecciosas podem tornar-se incontroláveis, havendo uma urgente necessidade de investigação e desenvolvimento de novas alternativas aos antimicrobianos atualmente disponíveis no mercado (51).

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endófitos associados às plantas medicinais são uma alternativa promissora neste campo de investigação. Esses compostos são substâncias orgânicas naturais de baixo peso molecular, ativas, em baixas concentrações, contra diversos microrganismos (43).

As **Munumbicinas A-E** são péptidos bioativos produzidos pelos actinomicetes *Streptomyces munumbi* isolado a partir da planta medicinal *Kennedia nigricans*. A Munumbicina C apresenta atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* fármaco-resistente, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus* sensível à Vancomicina, entre outros (52). Por sua vez, a Munumbicina D é considerada a molécula antimalárica *gold-standard*, sendo mais eficaz que a Colquicina (IC₅₀ da Munumbicina D é 50% mais baixo que o IC₅₀ da Colquicina) (27). Apesar do crescente volume de estudos realizados neste âmbito, a informação referente às estruturas químicas e ao modo de ação destes compostos continuam a ser relativamente escassas.

A **Kakadumicina A** também pertence à classe dos péptidos, tendo sido produzida pelo actinomicete *Streptomyces* sp. NRRL 30566 extraído da planta *Grevillea pteridifolia*. Este composto possui atividade contra o parasita da Malária *Plasmodium falciparum*, contra a bactéria *Bacillus anthracis* 40/BA 100 e contra outros microrganismos, apresentando Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) diferentes (53).

A Kakadumicina A e a Equinomicina (antibiótico pertencente à classe das quinoxalinas) apresentam estruturas químicas muito semelhantes e, muito provavelmente, partilham o mesmo mecanismo de ação que se fundamenta na inibição da síntese do RNA, após ligação ao DNA (49). Tal como as Munumbicinas, a Kakadumicina também carece de mais estudos científicos e avanços tecnológicos para elucidar melhor a cerca do seu potencial antimicrobiano e otimização de determinantes que influenciam o seu processo de síntese.

Outro composto antimicrobiano, designado de **Coronamicina**, foi descrito como sendo um complexo peptídico produzido pelo actinomicete *Streptomyces* sp. isolado da planta *Monstera* sp. Devido ao facto de os esporóforos se assimilarem a uma coroa, este metabolito secundário foi designado de Coronamicina, pois o termo “corona”, em espanhol, significa coroa. Outra característica inesperada desta substância é o facto de ela aderir ao vidro (27).

Estudos efetuados por David Ezra e os seus colaboradores permitiram identificar e caracterizar a atividade da Coronamicina contra o fungo patogénico humano *Cryptococcus neoformans* e contra o parasita malárico *Plasmodium falciparum*. A melhor bioatividade deste composto bioativo é contra o *P. falciparum*, manifestando-se assim como um provável agente antimalárico (54).

Em suma, apesar dos avanços científicos que se têm verificado nos últimos anos, estes e outros agentes antimicrobianos (como a Criptocandina, as Priconicinas A e B, o Ácido Coletótrico (29), ente outros) necessitam de serem alvo de maior investigação, tanto a nível molecular como a nível genético, na otimização de condições de cultura, no efeito das condições ambientais, para uma compreensão mais profunda a cerca da biodiversidade dos fungos endófitos e da regulação dos metabolitos secundários produzidos por eles.

Os fungos endófitos também conseguem produzir produtos naturais com atividade antifúngica, podendo ser alcalóides, terpenóides, esteróides, isocumarinas ou cromonas (55). De acordo com Sugashini Settu *et al.*, os fungos endofíticos *Plectophomella* sp., *Physalospora* sp. e *Crataegus monogyna* conseguem produzir, em meio de cultura, quatro metabolitos secundários com atividade antifúngica: a Micorrizina A, a Citocalasina E, a Citocalasina K e a Radicinina (ver Figura 3) (43).

Segundo Hidayat Hussain e os seus colaboradores, a **Micorrizina A** foi isolada do fungo endófito *Plectophomella* sp., tendo demonstrado uma boa atividade antifúngica contra *Ustilago violacea* e *Eurotium repens*. Por outro lado, as **Citocalasinas E e K** foram extraídas do *Physalospora* sp., e demonstraram boa atividade antifúngica e herbicida. Estes compostos são um grupo de metabolitos fúngicos que apresentam uma estrutura molecular diversificada e complexa e, apesar das pequenas diferenças estruturais entre eles, a Citocalasina E contendo uma fração cetona insaturada β , γ , comprovou ser ligeiramente mais ativa que a Citocalasina K, com uma porção lactona α , β -insaturada, sugerindo a importância na posição da ligação dupla para um aumento na atividade antimicrobiana destes compostos (56).

A **Radicinina** foi isolada do fungo endofítico *Crataegus monogyna* apresentando forte atividade antifúngica, porém fraca atividade antibacteriana e herbicida. Este composto é um metabólito fitotóxico e antibiótico produzido por alguns fungos fitopatogénicos, tendo sido extraído pela primeira vez na década de 1950, a partir de *Stemphylium radicinum*. Desde então tem sido produzido por várias espécies fúngicas, como é o caso de *Cochliobolus lunatus*, *Alternaria chrysanthemi*,

Alternaria helianthi, *Phoma andina*, *Curvularia* sp., *Alternaria radicina* e *Alternaria petroselini* (56,57).

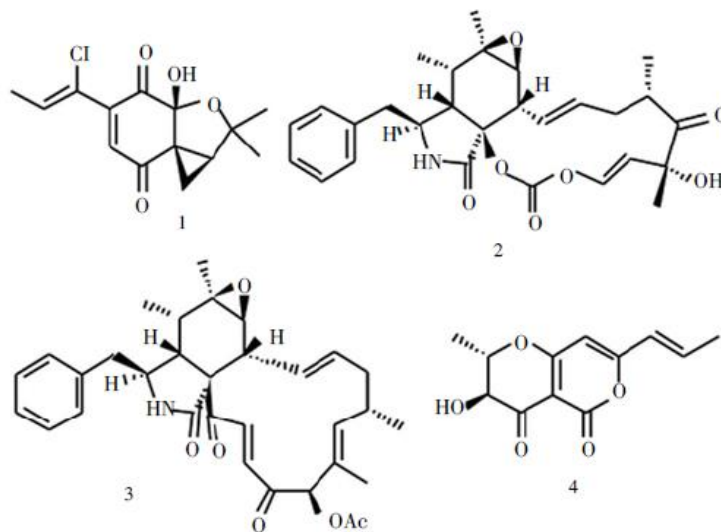


Figura 3 - Compostos antifúngicos isolados de *Plectophomella* sp., *Physalospora* sp. e *Crataegus monogyna*.

1: (-) - Micorrizina A, 2: Citocalasina E, 3: Citocalasina K, 4: Radicinina (50).

De acordo com Lu Yan *et al.*, existem outros compostos de elevada importância no âmbito da produção de novos compostos químicos extraídos de fontes naturais. Por exemplo, a **Sanguinarina** é um composto com atividade antibacteriana, anti-inflamatória e anti-helmíntica que foi isolada do fungo endófito *Fusarium proliferatum*, a partir da *Macleaya cordata*, num meio líquido de dextrose de batata; a **Reína**, um composto que possui atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, anticancerígena e propriedades hemostáticas, isolada do *Fusarium solani*, a partir da *Rheum palmatum* L. Por fim, destaca ainda o **Kaempferol**, um flavonóide natural extraído a partir da solução alcoólica ou metanólica da planta *Eupenicillium parvum*, isolado do fungo *Sinopodophyllum hexandrum* (24).

Segundo os estudos realizados por Pramod K.P. *et al.* e Mariana R.P. *et al.*, a **Hipericina** e a **Emodina** são metabolitos fúngicos produzidos pelo fungo endófito *Chaetomium globosum*, extraído a partir da planta medicinal indiana *Hypericum perforatum*. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana contra várias bactérias e fungos, incluindo *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e

organismos fúngicos, como por exemplo *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (29,49).

O **Ácido Ambuico** é um composto orgânico, classificado como uma ciclohexanona, com fraca atividade antifúngica, que foi isolada dos fungos *Pestalotiopsis* spp. e *Monochaetia* spp, a partir de plantas existentes em florestas tropicais (58).

Foi o primeiro produto natural a ter a sua estrutura estabelecida por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido, permitindo uma atribuição espacial ao grupo – OH no carbono 7 (ver Figura 4) (59,60). Após o seu isolamento e caracterização a nível estrutural, considera-se um dos melhores compostos devido à sua atividade biológica como inibidor do *quorum sensing* em bactérias Gram-positivas (61,62).

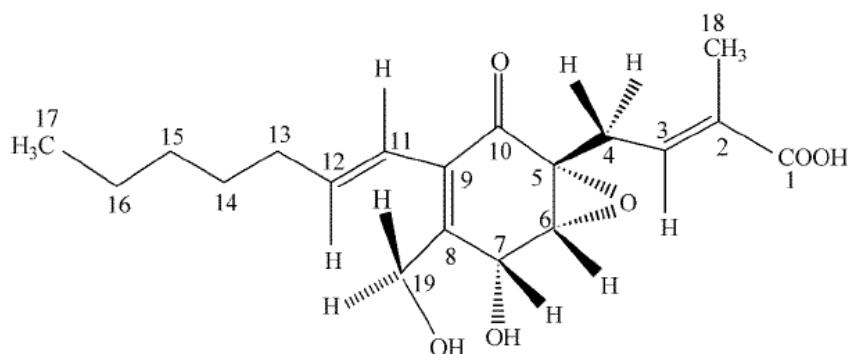


Figura 4 - A estrutura do agente antifúngico Ácido Ambuico (49).

Outra planta medicinal de origem asiática, denominada *Tripterygium wilfordii*, com importante atividade imunossupressora e antifúngica (contra *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum*), está intimamente relacionada com a síntese de dois novos compostos, a **Criptocandina** (um lipopeptídeo) e **Criptocina** (um ácido tetrânico incomum) (55).

4.3.3 Antioxidantes

Segundo a *University Health News*, os radicais livres são “moléculas altamente instáveis produzidas naturalmente através de vários processos fisiológicos do organismo ou então quando estamos expostos a toxinas, como por exemplo o fumo do

cigarro, a radiação ou a poluição ambiental” (63). A geração descontrolada destes compostos no organismo humano pode levar ao ataque da membrana lipídica, proteínas, enzimas e DNA, causando stress oxidativo que pode, em últimas instâncias, culminar com a apoptose celular (64).

Por conseguinte, essas Espécies Reativas de Oxigénio (ERO) encontram-se, frequentemente, na etiologia de várias patologias neurodegenerativas como por exemplo a doença de Alzheimer e de Parkinson, mas também de Diabetes Mellitus, cancro, aterosclerose, doenças inflamatórias ou, até mesmo, o envelhecimento precoce ou acelerado (49). Por forma a evitar ou atenuar o desencadeamento deste processo nocivo ao organismo, deve-se aumentar a toma ou administração de quantidades suficientes de antioxidantes exógenos. Por sua vez, os antioxidantes são moléculas estáveis que doam um eletrão a um radical livre, fazendo com que termine a reação em cadeia, iniciada pelas Espécies Reativas de Oxigénio, antes que se verifique a existência de danos celulares.

Alguns antioxidantes, como a glutathione, são produzidos pelo organismo para se defender naturalmente contra o stress oxidativo, enquanto outros obtemos através de dieta, como por exemplo o ácido ascórbico e os tocoferóis, frequentemente encontrados em plantas medicinais, vegetais e frutos (63).

No entanto, vários metabolitos secundários sintetizados pelos fungos endófitos têm sido reportados como uma fonte alternativa de novos antioxidantes naturais, tornando-os alvo de inúmeros estudos, cujo principal objetivo prende-se com a possibilidade de serem incorporados em terapêuticas promissoras (64).

A **Pestacina** e a **Isopestacina** são dois agentes antioxidantes que foram isolados do fungo *Pestalotiopsis microspore*, a partir de uma planta nativa da Papua Nova Guiné denominada *Terminalia morobensis* (65).

Segundo Mariana Recco Pimentel *et al.*, a Pestacina apresenta uma atividade antioxidante onze vezes mais elevada que o Trolox, um derivado da vitamina E, principalmente via clivagem de uma ligação C-H pouco reativa. Ainda segundo a visão de Mariana Recco Pimentel *et al.*, a Isopestacina possui atividade antioxidante através da eliminação dos radicais livres superóxido e hidróxi em solução, para além do facto de que a mesma é estruturalmente similar aos flavonóides, antioxidantes naturais pertencentes à classe dos polifenóis, abundantemente distribuídos na natureza (ver Figura 5) (49).

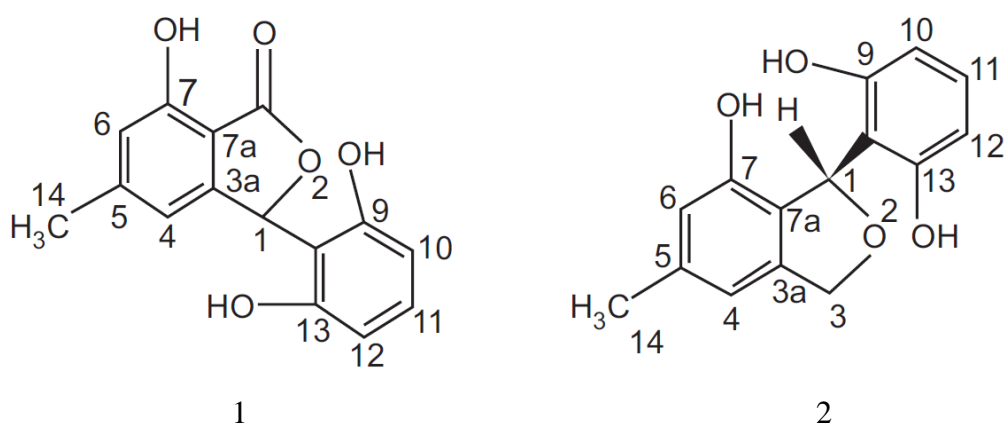


Figura 5 – Estrutura molecular de dois agentes antioxidantes sintetizados pelo fungo *Pestalotiopsis microspora*.

1: Pestacina, 2: Isopestacina (59).

Outro composto antioxidante é a **Grafislactona A**, um metabólito fenólico isolado do fungo endofítico *Cephalosporium* sp., residente na planta *Trachelospermum jasminoides* (65). O estudo realizado por Yong Chun Song *et al.* debruçou-se sobre a análise comparativa da Grafislactona A com vários outros antioxidantes, cujo objetivo era determinar qual dos compostos ostenta maior atividade antioxidante. Após a realização dos ensaios, concluiu-se que a Grafislactona A exibiu uma atividade de eliminação de radicais mais elevada, contra radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e contra radicais hidroxilo (OH[•]), do que os controlos positivos BHT e ácido ascórbico. Estes resultados sugerem que a grafislactona A pode efetivamente atenuar o processo de formação de radicais livres e, deste modo, reduzir a lesão celular induzida pelos mesmos (49,66).

Adicionalmente, a Grafislactona A suprimiu significativamente a formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) na oxidação de LDL induzida pelo Cu²⁺, demonstrando que pode atuar na prevenção da oxidação de LDL *in vivo* e no controlo da aterosclerose (66). Resumindo, este metabólito secundário, sintetizado pelo fungo endófito *Cephalosporium* sp., apresenta uma boa atividade antioxidante e, por isso mesmo, constitui uma fonte alternativa na síntese de novas moléculas com ação farmacológica relevante e com elevado interesse na área da indústria farmacêutica.

De acordo com Manomi Sarasan *et al.*, as algas e os seus simbiontes endofíticos associados também podem representar uma fonte alternativa de metabolitos secundários bioativos estruturalmente diversos, devido às tensões constantes impostas às mesmas pelos ambientes marinhos (67).

Vários estudos realizados por Abdel-Lattef *et al.* relataram a atividade antioxidante de derivados da hidroquinona como, por exemplo, 7-isopropenilbicyclo [4.2.0] octa-1,3,5-trieno-2,5-diol, 1,2- (1-hidroxi-1-metil) -2, 3-di-hidrobenzofuran-5-ol, de *Acremonium* sp., isolado da alga *Cladostephus spongius* da costa espanhola. Por outro lado, o fungo *Epicoccum* sp., isolado da alga marinha *Fucus vesiculosus*, também provou ser uma boa fonte de antioxidantes (68).

Estes compostos expressaram atividade significativa na eliminação de radicais livres DPPH e na inibição da peroxidação do ácido linolénico, constituindo uma fonte promissora de compostos antioxidantes, que poderão vir a ser inseridos em terapêuticas futuras.

4.3.4 Outros compostos

Os fungos endófitos conseguem produzir uma panóplia de outros compostos com atividades diferentes das que foram referidas nos capítulos anteriores, como por exemplo, antivirais, antidiabéticas, anti-inflamatórias, imunossupressoras, antiolesterolémicas, antihipertensoras, antimaláricas, anti-inseticidas, entre outras (24,29,43).

Um estudo realizado pela OMS em 2018, salienta as patologias com maior necessidade de intervenção, sendo praticamente todas de origem viral (69). No seguimento desta informação, torna-se crítico investir e desenvolver novos compostos antivirais para produção de novos fármacos ou vacinas, cujo principal objetivo se centra na imunização da população.

O fungo endofítico *Emericella* sp. consegue sintetizar dois derivados de **Isoindolona**, a partir da casca interna de *Aegiceras corniculatum*, que apresentam atividade antiviral moderada contra o vírus Influenza A (H1N1) (70), enquanto a **Pularina A** é um metabolito secundário antiviral contra o Herpes Vírus tipo 1 (HSV-1) produzido por *Endoptis Pullaria* sp. a partir das folhas de *Caulophyllum* sp., oriunda da Tailândia (28).

Por sua vez, Ravindra Patil *et al.* retrataram a existência de um composto anticolésterolémico designado de **Monacolina K / Lovastatina**, isolado de *Aspergillus niger* PN2 associado à planta *Taxus baccata* (65). Este composto é muito importante na indústria farmacêutica, uma vez que a hipercolesterolémia é uma das patologias crônicas mais comuns nos países desenvolvidos e, como tal, a síntese deste composto contribuirá para a diminuição de eventos cardiopatológicos.

Adicionalmente, a existência de compostos com atividade inseticida a partir dos fungos endofíticos foi reportada por Bryn H. Daisy *et al.* com a descoberta do **Naftaleno** isolado de *Muscodor vitigenus*, proveniente da planta medicinal *Paullina paullinioides* (71).

Segundo o Relatório do Programa Nacional para a Diabetes, publicada pela Direção Geral de Saúde (DGS) em 2017, “a prevalência da diabetes no território nacional foi de 13,3% no ano de 2015, sendo que cerca de 44% da população portuguesa ainda não foi diagnosticada” (72). Ainda de acordo com este relatório, “a diabetes tem um contributo significativo nas causas de morte, sendo correntemente responsável por mais de 4% das mortes das mulheres e mais de 3% das mortes nos homens, ou seja, atualmente por ano morrem cerca de 2200-2500 mulheres e cerca de 1600-1900 homens por diabetes”. Por isso mesmo, torna-se indispensável investir na investigação e desenvolvimento de novos agentes com ação antidiabética.

Estudos efetuados por Lu Yan *et al.* demonstraram a existência de um novo composto antidiabético, denominado **Gimnemagenina**, que é sintetizado pelo fungo endófito *Penicillium oxalicum* a partir da *Gymnema sylvestre*.

De acordo com o Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável publicado pela DGS em 2018, a hipertensão arterial é “um dos principais problemas de saúde pública no nosso país, pela expressão das pessoas afetadas e pelas consequências na sociedade” e “afeta cerca de 36% da população adulta, estando associada a diversas doenças e situações clínicas, entre elas o Acidente Vascular Cerebral (AVC) que é, em Portugal, umas das principais causas de morte e de incapacidade” (73).

Um dos compostos que revelou atividade anti-hipertensora a partir do isolamento de fungo endofítico *Phomopsis* sp. XP-8 associado a *Eucommia ulmoides* Oliver foi o **Diglucosido de Pinoresenol** (24).

Adicionalmente, os imunossupressores **Subglutinol A e B**, identificados a partir do fungo endofítico *Fusarium subglutinans*, visam ter um papel ativo na

rejeição de aloenxertos no transplante, que pode ser utilizado para tratar doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide e a diabetes dependente de insulina (29).

Em suma, os fungos endofíticos representam uma fonte largamente inexplorada de novos compostos químicos que podem ter aplicações biomédicas e biotecnológicas significativas, sendo a investigação e desenvolvimento de tais metabolitos derivados de fungos endofíticos necessária de maior aprofundamento. O desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas efetivas para a caracterização desses fungos, a otimização das condições de cultura e a engenharia genética são exemplos de abordagens que proporcionarão a síntese destas ferramentas promissoras no mundo das Ciências Farmacêuticas.

5 Conclusões e perspectivas futuras

Os fungos endófitos são um grupo de microrganismos que têm sido amplamente investigados, principalmente nas duas últimas décadas, pois são uma fonte inesgotável de novos compostos bioativos com potencial para serem integrados numa ampla variedade de áreas, tais como, medicina, agricultura e indústria farmacêutica.

As várias temáticas que despoletaram o interesse pela investigação e desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas são a resistência aos antimicrobianos, a utilização de fármacos de última linha terapêutica e a ausência de tratamento para vários tipos de cancro e doenças neurodegenerativas. O estudo dos fungos endófitos associados às plantas medicinais surge assim como uma possível solução para essas mesmas problemáticas.

Com a crescente relevância desta temática na área da saúde, surge também uma tendência crescente de realização de estudos sobre estes seres, explorando temáticas como a sua elevada diversidade biológica, a capacidade de produzirem metabolitos secundários semelhantes/idênticos aos produzidos pelas suas plantas hospedeiras, a interação e evolução da relação simbiótica existente entre o fungo endófito e a planta hospedeira, entre outras.

O isolamento dos metabolitos secundários dos fungos endófitos surge então como ferramenta promissora na área das ciências farmacêuticas, na medida em que a sua composição biologicamente ativa pode exercer uma ação farmacológica anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, anti-inflamatória, antidiabética e outras.

No entanto, existem ainda desafios que necessitam de ser ultrapassados para que a indústria farmacêutica possa beneficiar completamente desta fonte tão promissora. Alguns dos desafios apontados são os baixos níveis de rendimentos, a

falta de informação adjacente à interação simbiótica destes dois seres, o conhecimento limitado referente à interação dos fungos endófitos com outros organismos e a dificuldade em aumentar a produção a nível industrial.

Sendo assim, torna-se crucial aprofundar o conhecimento já existente por forma a responder a questões como: de que forma é que os fungos endófitos colonizam as plantas medicinais? Como é que se equilibram as defesas da planta hospedeira com a virulência do fungo endofítico? Ou como e por que razão os fungos endófitos produzem metabolitos secundários que são considerados tóxicos e, no entanto, demonstram simultaneamente resistência?

Estudos futuros relacionados com a temática evidenciada na presente tese poderão abranger os avanços biotecnológicos nas áreas da engenharia genética, tecnologia metabólica, otimização de condições de fermentação, *genome shuffling*, plataformas biotecnológicas inovadoras e bioinformática. Melhorias futuras nas áreas enumeradas poderão proporcionar uma compreensão mais abrangente das interações moleculares endofíticas e dos diversos processos associados cujo principal objetivo se resume à produção sustentada de compostos com relevância para a indústria farmacêutica.

6 Referências Bibliográficas

1. Willis KJ. State of the World's Fungi 2018. Report. R Bot Gard - Kew. 2018;92.
2. Tortora G, Funke B, Case C. Microbiologia. In: Artmed, editor. 8th ed. 2012. p. 334–45.
3. Alharbi SA, Wainwright M, Alahmadi TA, Bin Salleeh H, Faden AA, Chinnathambi A. What if Fleming had not discovered penicillin? Production and hosting by Elsevier. Saudi J Biol Sci [Internet]. 2014;21:289–93. Available from: www.ksu.edu.sawwww.sciencedirect.com<http://dx>.
4. Kusari S, Singh S, Jayabaskaran C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi : hope versus hype. 2014;32(6):297–303.
5. Andersen P. [The Nobel Prize in physiology or medicine 1967]. [Internet]. Vol. 87, Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke. 1967 [cited 2019 Jul 14]. p. 1926–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5590464>
6. Aparecida J, Maria E, Lucas F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. 2008;31(7):1807–13.
7. Ferreira WC, Sousa JC. Microbiologia - Volume 2. Lidel, editor. 2000. 352 p.
8. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology. 6th ed. Mosby, editor. 2008.
9. O P, Hinkle G, Stickel SK, L M. Monophyletic Origins of the Metazoa : An Evolutionary Link with Fungi. Science (80-). 1973;
10. Lücking R, Huhndorf S, Pfister DH, Plata ER, Lumbsch HT. Fungi evolved right on track. Mycologia [Internet]. 2009;101(6):810–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19927746>
11. Houbraken J, Frisvad JC, Samson' RA. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens* . IMA Fungus. 2011;2(1):87–95.
12. Aly AH, Debbab A, Proksch P. Fifty years of drug discovery from fungi. Fungal Divers. 2011;50:3–19.
13. Walker S. Microbiology. London: Elsevier Health Sciences; 1998. 504 p.
14. Cowan MK, Talaro KP. Microbiology : a systems approach. 2nd ed. Boston; 2009. 869 p.

15. Berbara R, Souza F, Fonseca H. III-Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição [Internet]. 2006 [cited 2019 Aug 28]. p. 33. Available from: <https://www.researchgate.net>
16. Carlile M, Watkinson S, Gooday G. *The Fungi*. 2nd ed. 2001. 588 p.
17. Helmenstine AM. Anabolism and Catabolism: Definition and Examples [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 3]. Available from: <https://www.thoughtco.com/anabolism-catabolism-definition-examples-4178390>
18. Goyal S, Ramawat KG, Mérillon J-M. Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview. *Fungal Metab*. 2017;1–29.
19. Mustansiriyah University. Fungal Metabolism [Internet]. 2017 [cited 2019 Sep 3]. p. 1–4. Available from: https://uomustansiriyah.edu.iq/media/lectures/6/6_2017_01_21!08_16_33_PM.pdf
20. Fox EM, Howlett BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(6):481–7.
21. Calvo A, Wilson R, Bok JW, Keller N. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(3):51.
22. Venugopalan A, Srivastava S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6):873–87.
23. Yan L, Zhu J, Zhao X, Shi J, Jiang C, Shao D. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;
24. Yan L, Zhao H, Zhao X, Xu X, Di Y, Jiang C, et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(15):6279–98.
25. Wilson D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*. 1995;73:274–86.
26. Busby PE, Ridout M, Newcombe G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Mol Biol*. 2016;90(6):645–55.
27. Martinez-Klimova E, Rodríguez-Peña K, Sánchez S. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*. 2017.
28. de Carvalho CR, Ferreira MC, Amorim SS, da Silva Florindo RH, de Assis JCS, Zani CL, et al. Bioactive Compounds of Endophytic Fungi Associated with Medicinal Plants. 2019. 303–361 p.
29. P.K. P, S. S, R.N.S. Y, A.K. S, M. CKS. Fungal endophytes: Promising tools for pharmaceutical science. *Int J Pharm Sci Rev Res* [Internet]. 2014;25(2):128–38. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84898722971&partnerID=40&md5=b7206d1e2153550589ed000b624621c9>
30. Chandra S. Endophytic fungi: Novel sources of anticancer molecules. *Adv Endophytic Res*. 2012;389–422.
31. Li S, Zhang X, Wang X, Zhao C. *European Journal of Medicinal Chemistry Novel*

- natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018;156:316–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.015>
32. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chbiol* [Internet]. 2012;19:792–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>
 33. Pimentel MR, Molina G, Dion AP, Pastore M. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. 2011;2011.
 34. Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. *Front Microbiol*. 2016;7(JUN):1–14.
 35. Naik S. How and why do endophytes produce plant secondary metabolites ? 2019;
 36. Bandh SA, Nisa H, Shameem N, Nawchoo IA, Shafi S, Kamili AN. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microb Pathog*. 2015;82(April):50–9.
 37. Ghebreyesus TA. World Health Organization [Internet]. 2019. [cited 2019 Aug 11]. Available from: <https://www.who.int/cancer/en/>
 38. Kusari S, Singh S, Jayabaskaran C. Rethinking production of Taxol W (paclitaxel) using endophyte biotechnology §. 2014;32(6).
 39. Ma YM, Qiao K, Kong Y, Li MY, Guo LX, Miao Z, et al. A new isoquinolone alkaloid from an endophytic fungus R22 of *Nerium indicum*. *Nat Prod Res*. 2017;31(8):951–8.
 40. Uzma F, Mohan CD, Hashem A, Konappa NM, Rangappa S, Kamath P V., et al. Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review. *Front Pharmacol*. 2018;9(APR):1–37.
 41. Thomas CJ, Rahier NJ, Hecht SM. Camptothecin: Current perspectives. *Bioorganic Med Chem*. 2004;12(7):1585–604.
 42. Kusari S, Zu S, Spiteller M. Rapid communications. *Histochem J* [Internet]. 2009;10(5):495–495. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01003131>
 43. Settu S, Arunachalam S, Segaran G. Endophytic Fungi: A Review on Pharmacological Activities and Its Industrial Application. 2018;53(16):82–9.
 44. Palem PPC, Kuriakose GC, Jayabaskaran C. An endophytic fungus, *talaromyces radicus*, isolated from *catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. *PLoS One*. 2015;10(12).
 45. Palem PPC, Kuriakose GC, Jayabaskaran C. Correction : An Endophytic Fungus , *Talaromyces radicus* , Isolated from *Catharanthus roseus* , Produces Vincristine and Vinblastine , Which Induce Apoptotic Cell Death. 2016;1–6.
 46. Kumar V, Rai S, Gaur P, Fatima T. Endophytic fungi: Novel sources of

- anticancer molecules. *Adv Endophytic Res.* 2014;389–422.
47. Zi CT, Yang L, Xu FQ, Dong FW, Yang D, Li Y, et al. Synthesis and anticancer activity of dimeric podophyllotoxin derivatives. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:3393–406.
 48. Kamal A, Ali Hussaini SM, Rahim A, Riyaz S. Podophyllotoxin derivatives: A patent review (2012 - 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2015;25(9):1025–34.
 49. Pimentel MR, Molina G, Dionísio AP, Maróstica Junior MR, Pastore GM. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnol Res Int.* 2011;2011:1–11.
 50. Deshmukh SK, Mishra PD, Kulkarni-Almeida A, Verekar S, Sahoo MR, Periyasamy G, et al. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. *Chem Biodivers.* 2009;6(5):784–9.
 51. WHO. World Health Organization [Internet]. Antibiotic resistance. 2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/antimicrobial-resistance>
 52. Jensen JB, Condron MAM, Yaver D, Robison R, Stevens D, Porter H, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans* a. *Microbiology.* 2002;148(9):2675–85.
 53. Castillo U, Harper JK, Strobel GA, Sears J, Alesi K, Ford E, et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;224(2):183–90.
 54. Ezra D, Castillo UF, Strobel GA, Hess WM, Porter H, Jensen JB, et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology.* 2004;150(4):785–93.
 55. Strobel G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *J Fungi.* 2018;4(2).
 56. Hussain H, Kliche-Spory C, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Abbas G, Green IR, et al. Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(S1):S224–7.
 57. Suzuki M, Sakuno E, Ishihara A, Tamura JI, Nakajima H. Conversions of deoxyradicin to radicin and of radicin to 3-epi-radicin in the phytopathogenic fungus *Bipolaris coicis*. *Phytochemistry.* 2012;75:14–20.
 58. PubChem. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ambuic acid, CID=11152290. 2019.
 59. Harper JK, Mulgrew AE, Li JY, Barich DH, Strobel GA, Grant DM. Characterization of stereochemistry and molecular conformation using solid-state NMR tensors. *J Am Chem Soc.* 2001;123(40):9837–42.
 60. Harper JK, Barich DH, Hu JZ, Strobel GA, Grant DM. Stereochemical analysis by solid-state NMR: Structural predictions in ambuic acid. *J Org Chem.* 2003;68(12):4609–14.

61. Li JY, Harper JK, Grant DM, Tombe BO, Bashyal B, Hess WM, et al. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry*. 2001;56(5):463–8.
62. Nakayama J, Uemura Y, Nishiguchi K, Yoshimura N, Igarashi Y, Sonomoto K. Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quormones in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):580–6.
63. UHN STAFF. What Do Antioxidants Do? And Why Are They Important? [Internet]. 25-06-2018. 2018 [cited 2019 Aug 24]. Available from: <https://universityhealthnews.com/daily/nutrition/what-do-antioxidants-do-and-why-are-they-important/>
64. Rajamanikyam M, Vadlapudi V, Amanchy R, Upadhyayula SM. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2017;60(December):1–26.
65. Patil RH, Patil MP, Maheshwari VL. Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi. 2016;49:189–205.
66. Song YC, Huang WY, Sun C, Wang FW, Tan RX. Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(3):506–9.
67. Sarasan M, Puthumana J, Job N, Han J, Lee JS, Philip R. Marine algicolous endophytic fungi-a promising drug resource of the era. *J Microbiol Biotechnol*. 2017;27(6):1039–52.
68. Abdel-Lateff A1, König GM, Fisch KM, Höller U, Jones PG WA. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. *J Nat Prod* [Internet]. 2002; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444684>
69. WHO. List of Blueprint priority diseases [Internet]. 2018. 2018 [cited 2019 Aug 25]. p. 17. Available from: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/en/>
70. Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z, Gu J, Li D, et al. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*. 2011;72(11–12):1436–42.
71. Daisy BH, Strobel GA, Castillo U, Ezra D, Sears J, Weaver DK, et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscador vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 2002;148(11):3737–41.
72. DGS. Programa Nacional para a Diabetes [Internet]. 2017 [cited 2019 Aug 25]. p. 20. Available from: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/relatorio-do-programa-nacional-para-a-diabetes-2017.aspx>
73. DGS. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável [Internet]. 2018 [cited 2019 Aug 25]. p. 51. Available from: <https://nutrimento.pt/noticias/importancia-do-potassio-da-alimentacao-na-regulacao-da-pressao-arterial/>

74. Xu F, Wang S, Li Y, Zheng M, Xi X, Cao H, et al. Yield enhancement strategies of rare pharmaceutical metabolites from endophytes. *Biotechnol Lett.* 2018;40(5):797–807.

7 Anexos

A1. Metabolitos secundários com ação anticancerígena.

Tabela 1 – Exemplos de metabolitos secundários com ação anticancerígena que são produzidos pelos fungos endófitos, extraídos das respectivas plantas medicinais. Adaptado de (23,28,75).

Atividade Biológica	Compostos Bioativos	Fungos Endófitos	Plantas Medicinais	Referências
Anticancerígena	Brefeldina A and B	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i>	J. Wang, Y. Huang, M. Fang, Y. Zhang (2002)
	Vincristina e Vinblastina	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	A. Kumar, D. Patil, P.R. Rajamohanan, A. Ahmad (2013)
	Paclitaxel (Taxol)	<i>Cladosporium oxysporum</i>	<i>Moringa oleifera</i>	Raj, Manikandan, Arulvasu e Pandi (2015)
		<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	G. Strobel, X. Yang, J. Sears, R. Kramer (1996)
	Ácido Torreianico	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus taxifolia</i>	Lee <i>et al.</i> , 1996
	Podofilotoxina e análogos	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Sabina recurva</i>	Cao <i>et al.</i> , 2007
		<i>Alternaria neesex</i>	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Kour <i>et al.</i> , 2008
	Camptotecina	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	Pu <i>et al.</i> (2013)

A2. Metabolitos secundários com ação antimicrobiana.

Tabela 2 - Exemplos de metabolitos secundários com ação antimicrobiana que são produzidos por fungos endófitos e actinomicetes, extraídos das respectivas plantas medicinais. Adaptado de (23,28,75).

Atividade Biológica	Compostos Bioativos	Fungos Endófitos	Actinomicetes	Plantas Medicinais	Referências
Antimicrobiana	Criptocandina A	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	---	<i>Tripterigeum wilfordii</i>	Strobel GA <i>et al.</i> (1999)
	Kakadumicina	---	<i>Streptomyces sp. NRRL 30566</i>	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Castillo U, Harper JK, Strobel GA <i>et al.</i> (2003)
	Munumbicinas A, B, C, D	---	<i>Streptomyces munumbi</i>	<i>Kennedia nigriscans</i>	Castillo U, Strobel GA, Ford EJ <i>et al.</i> (2002)
	Ácido Ambuico	<i>Pestalotiopsis microspore, Monochaetia sp.</i>	---	Plantas de florestas tropicais	G. Ding, Y. Li, S. Fu <i>et al.</i> (2009)
	Ergosterol	<i>Hormonema spp. Rhizoctonia sp.</i>	---	<i>Cynodon dactylon</i>	F. Pelaez, A. Cabello, G (2000)
	Criptocina	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	---	<i>Tripterigeum wilfordii</i>	J.Y. Li, G. Strobel, J. Harper (2000)
	Patulina	<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	---	<i>Taxus mairei</i>	C.L. Zhang, B.Q. Zheng (2008)

A3. Metabolitos secundários com ação antioxidante.

Tabela 3 - Exemplos de metabolitos secundários com ação antioxidante que são produzidos pelos fungos endófitos, extraídos das respectivas plantas medicinais. Adaptado de (23,28,75).

Atividade Biológica	Compostos Bioativos	Fungos Endófitos	Plantas Medicinais	Referências
Antioxidante	Grafislactona A	<i>Cephalosporium sp.</i>	<i>Cephalosporium sp.</i>	Patil RH, Patil MP, Maheshwari VL. (2016)
	Pestacina e a Isopestacina	<i>Pestalotiopsis microspore</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Patil RH, Patil MP, Maheshwari VL. (2016)
	Ácido gálico	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fritillaria unibracteata</i>	Pan <i>et al.</i> (2017)
	oxo-Agarospirol	<i>Arthrinium sp. 0042</i>	<i>Aquilaria subintegra</i>	Monggoot <i>et al.</i> (2017)
	Amidas fenilpropanóides	<i>Penicillium brasilianum</i>	<i>Melia azedarach</i>	Kusari S, Zuhlke S, Spiteller M (2009)

A4. Metabolitos secundários com outras ações terapêuticas.

Tabela 4 - Exemplos de metabolitos secundários com outras ações que são produzidos pelos fungos endófitos, extraídos das respectivas plantas medicinais. Adaptado de (23,28,75).

Atividade Biológica	Compostos Bioativos	Fungos Endófitos	Plantas Medicinais	Referências
Outras	Isoindolona	<i>Emericella sp.</i>	<i>Aegiceras corniculatum</i>	Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z (2011)
	Pularina A	<i>Endoptia Pullaria sp.</i>	<i>Caulophyllum sp.</i>	de Carvalho CR, Ferreira MC <i>et al.</i> (2019)
	Monacolina K/Lovastatina	<i>Aspergillus niger</i> PN2	<i>Taxus baccata</i>	Patil RH, Patil MP, Maheshwari VL. (2016)
	Naftaleno	<i>Muscodor vitigenus</i>	<i>Paullina paullinioides</i>	Daisy BH, Strobel GA, Castillo U (2002)
	Subglutanol A e B	<i>Fusarium subglutinans</i>	---	P.K. P, S. S, R.N.S. Y, A.K. S (2014)